

**Intyg
Certificate**



Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

(71) Sökande Kurt G I Nilsson, Lund SE
Applicant (s) Carl-Fredrik Mandenius, Huddinge SE

(21) Patentansökningsnummer 9301270-6
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1993-04-17
Date of filing

Stockholm, 1995-01-23

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office

Åsa Dahlberg
Åsa Dahlberg

Avgift
Fee 170:-

Sv. Patentverket

1993 -04- 17

BIOSENSOR

Föreliggande uppfinning hänför sig till en biosensor i vilken en kolhydrat eller ett derivat därav används för att via specifik inbindning av ett protein, ett virus eller en cell generera en detekterbar signal.

Bakgrund.

Biosensorer karakteriseras av fysikalisk eller kemisk mätgivare (signalöverförare) vars respons aktiveras av en specifik interaktion mellan en biokemisk struktur (som direkt eller indirekt bundits till mätgivaren) och en eller flera analyter.

Biosensorer används för att påvisa analyten/er och i vissa fall även för att kvantifiera analyten/er.

Biosensors fördelar utgörs av att en fysikalisk eller kemisk mätgivare mha den bundna biokemiska strukturen tilldelats specificitet så att en allmän fysikalisk eller kemisk parameter (t.ex. temperatur, pH, optisk täthet) kan utnyttjas för att detektera en enda substans i en komplex blandning av icke-specifika substanser.

Biosensors begränsningar utgörs av den biokemiska strukturens specificitet, specificitetsbredd och stabilitet, samt av att mätgivaren måste göras oberoende av mätmediets bakgrundsförändring i den parameter givaren mäter. I Methods of Enzymology, volym 137, beskrivs i ett antal artiklar olika aspekter av biosensorer.

Definitioner:

Biosensor - fysikalisk eller kemisk signalöverförare, t.ex. fotometer, kemisk elektrod, temperaturgivare, tryckgivare, som direkt eller indirekt förenats med en biokemisk struktur. Som biokemisk struktur har i tidigare kända biosensorer utnyttjats företrädesvis enzym, specifikt protein, antikropp och därmed har biosensors bibringats egenskapen att kunna påvisa substanser som specifikt binder den biokemiska strukturen i kvalitativa eller kvantitativa mått.

Reflektansmätning - mätning av intensiteten hos ljus reflekterat från en yta där ytans egenskaper påverkar reflektansen, t.ex. biomolekyler som ändrar ytans brytningsindex.

Polarisationsmätning - mätning av polariserat ljus polarisationstillstånd, vanligen polarisationsvinkel, beroende av biomolekyler, virus eller cellers inbindning.

Ytplasmonspektroskopi - optisk fysikalisk mätteknik som utnyttjar tunna metallgränsskikt s.k. ytplasmontillstånd, för att med stor känslighet påvisa förändringar i brytningsindex, t.ex. orsakad av biomolekyler närvaro i gränsskiktet.

Ellipsometri - optisk fysikalisk mätteknik som med stor känslighet påvisar förändringar i brytningsindex vid gränsskikt genom att mäta förändringar i ellipticitet hos polariserat ljus, t.ex. orsakad av biomolekyler närvaro i gränsskiktet.

Piezoelektrisk kristall - kristall vars egensvängningsfrekvens kan påverkas av massändring eller tryckändring och som kan registreras elektriskt, t.ex. massändring åstadkommen av biomolekyl(er), virus eller cell(er) som bundit till kristallytan.

Ink i Patentverket

1993-04-17

2.

Elektrokemisk elektrod - mätgivare som genererar en elektrisk signal pga en elektrokemisk reaktion vid elektroden som är relaterad till en kemisk parameter, t.ex. pH, pO_2 , pCO_2 , vilkas värden kan variera beroende på förekomst av analyt(er) i ett prov specifika för ett ämne bundet till mätgivaren.

Termistor - elektrisk resistansmätare som ändrar ledningsförmåga med temperaturen; biokemiska reaktioner är bl.a. karakteriserade av specifika värden på värmeupptag/utveckling, vilka således kan registreras via termistorn.

Ett stort antal av de kolhydratsekvenser som förekommer i glykoproteiner eller i glykolipider, och vanligen också mindre fragment av dessa sekvenser, uppvisar biospecifik bindning till proteiner, virus eller celler.

Föreliggande uppfinning beskriver en biosensor där denna specificitet utnyttjas för analys/bestämning av sådan komponent i ett prov. Uppfinningen karakteriseras av att kolhydraten eller ett derivat därav bundits till en yta i biosensorn.

Som kolhydrat används vanligen fragment (oligosackarider) av de kolhydratsekvenser som förekommer i glykoproteiner eller i glykolipider och vanligen används mindre fragment av dessa sekvenser, dvs disackarid, trisackarid, tetrasackarid eller pentasackarid, eftersom denna storlek ofta är fullt tillräcklig för att oligosackariden skall uppvisa biospecifik bindning av ett protein, ett virus eller en cell. En redogörelse för olika sådana kolhydratsekvenser återfinns bl.a. i Chemistry and Physics of Lipids, vol. 42, sid. 153-172, 1986 och i Ann. Rev. Biochem. vol. 58, sid. 309-50, 1989.

Vanligen är oligosackariden modifierad i den reducerande änden med en s.k. aglykon, vilken utgörs av en glykosidiskt bunden organisk grupp som lämpar sig för inbindning till ytan i biosensorn. Exempel på aglykoner är $-OEtSEtCONHNH_2$, $-OEtPhNH_2$, etc. Inbindningen kan ske till ytan i biosensorn direkt eller via ett protein som t.ex. bovint serum albumin eller via en kemisk struktur som adsorberats eller kovalent bundits till ytan. En sådan kemisk struktur kan innehålla reaktiva organiska grupper såsom exempelvis karboxyl-, sulfonat, cyanat-, epoxi-, aldehydgrupper eller andra grupper lämpliga för kemisk konjugering med t.ex. en amin eller tiol grupp i aglykonen.

Mer specifika exempel på analyter vilka kan analyseras med biosensor enligt föreliggande uppfinning är lektiner, antikroppar mot kolhydrater, patogena virus eller bakterier som exempelvis urinvägsbakterier (exempelvis P-fimbrierad E. coli) eller luftvägspatogener, samt bakterier som orsakar infektioner/diarreer i tarmkanalen.

Biosensorn enligt uppfinningen kan vara utformad i ett stort antal möjliga konfigurationer. Exempel härpå är:

a) plan kolhydrat-yta som med lätthet kan kontaktas med provvätska, exempelvis en yta utformad som en sticka, varpå ytan kan placeras i mätinstrument för optisk reflektansmätning i luft.

1993-04-17

3.

b) flödessystem med provgenomflödescell vars ytor förenats med kolhydrat och där signalöverföring görs med optisk, elektrokemisk, termisk eller gravimetrisk mätmetod och där mätgivaren är placerad i eller nära anslutning till cellen.

c) mätbehållare, kyvettmodell, som förenats med signalöverförande givare med kolhydrat till vilken mätvätskan tillförs.

d) plan kolhydratyta som ytgörs av en del av signalöverföraren som med lätthet kan bringas i kontakt med provvätska under lämpligt tidsintervall, varefter provvätskan avlägsnas och signalöverförarytan karaktäriseras med fysikalisk mätmetod, t.ex. elektronisk mätning, gravimetrisk mätning eller termisk mätning.

I några situationer, t.ex. för att öka biosensorsignalen vid mätning av låga koncentrationer av celler, kan det vid mätning av analyt med biosensorn vara fördelaktigt att efter inbindning av analyt till kolhydratyten tillsätta mikropartiklar försedda med exempelvis kolhydrat som binder till den bundna cellen.

Ytan i biosensorn kan utgöras av exempelvis en guldyta eller en modifierad guldyta, plastyta som belagts med en guldyta, silveryta eller en annan metallyta eller modifieringar därav med polymerer till vilka kemisk koppling av kolhydrat kan ske.

Nedan ges icke-begränsande exempel på kolhydratyta som kan utnyttjas i biosensor enligt uppfinningen för inbindning och analys/bestämning av patogena urinvägsbakterier.

EXEMPEL

Ett exempel utfördes som följer: Kiselyta belagd med ett guldsikt modifierades med merkaptopropionsyra genom att nedsänka ytan i en 5 mM lösning av syran. Karboxylgrupperna modifierades med karbodiimid (EDC) under 2 timmar varpå digalaktosid med aglykon ($\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta\text{-OEtSEtCONHNH}_2$), kopplades till den EDC-aktiverade ytan under 12 timmar vid pH 8.5 och ytan sköljdes därefter med buffert.

Den så med digalaktosid modifierade guldytan nedsänktes under 60 minuter (denna tid kan varieras) i ett prov med urinvägsinfektionsbakterier (s.k. p-fimbrierade E.coli) med $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -specifikt receptorprotein, varefter ytan sköljdes med destillerat vatten i 2 minuter.

En annan guldyta derivatiserad p.s.s. med $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ nedsänktes i ett prov innehållande en annan icke-infektionsframkallande E. coli stam som saknar $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -specifikt receptorprotein. Inbindningsgraden av olika bakterier jämfördes mellan ytorna mha elektronmikroskop. Bakterien med $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -receptor band in i ett 10-15 faldigt överskott jämfört med den andra bakterien.

Inbindningen av p-fimbrierade E.coli till en guldyta modifierad med enbart merkaptopropionsyra var ca 20 ggr lägre än till den $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$ -modifierade ytan.

Ink i Patentverket

1953 -04- 17

4.

PATENTKRAV

1. Biosensor, kännetecknad av att minst en kolhydrat eller ett derivat därav med förmåga att binda ett protein, ett virus eller en cell är kovalent bunden till en yta i biosensorn.
2. Biosensor enligt krav 1, kännetecknad av att kolhydraten är kemiskt bunden till en yta som utgör en del av biosensorns signalöverföringsdel.
3. Biosensor enligt krav 1, där biosensorn är en optisk biosensor som ger en signaländring vid inbindning av ett protein, ett virus eller en cell till en yta i biosensorn.
4. Biosensor enligt krav 3, där den optiska biosensorn utnyttjar ytplasmonstillståndsförändringar, ellipsometri, reflektansmätning eller polarisationsmätning.
5. Biosensor enligt krav 1, där biosensorn är baserad på en piezoelektrisk kristall, elektrokemisk elektrod eller en termistor.
6. Biosensor enligt krav 1, där kolhydraten är en oligosackarid eller ett derivat därav som bundits via en aglykon till en yta i biosensorn.
7. Biosensor enligt krav 1, där kolhydraten är en oligosackarid eller ett derivat därav som bundits via en aglykon till en guldyta i biosensorn.
8. Metod att binda ett kolhydrat eller ett derivat därav till en guldyta, karakteriserat av att ytan först täcks av en tiolförening som innehåller en organisk grupp som kan utnyttjas för kemisk bindning av ett kolhydrat eller ett derivat därav.
9. Guldyta modifierad med kolhydrat eller ett derivat därav.
10. Användning av biosensor enligt krav 1 för bestämning och eller analys av ett protein, ett virus, eller en cell.

5.

SAMMANFATTNING

Föreliggande uppfinning hänför sig till en biosensor i vilken en kolhydrat eller ett derivat därav används för att via specifik inbindning av ett protein, ett virus eller en cell generera en detekterbar signal.